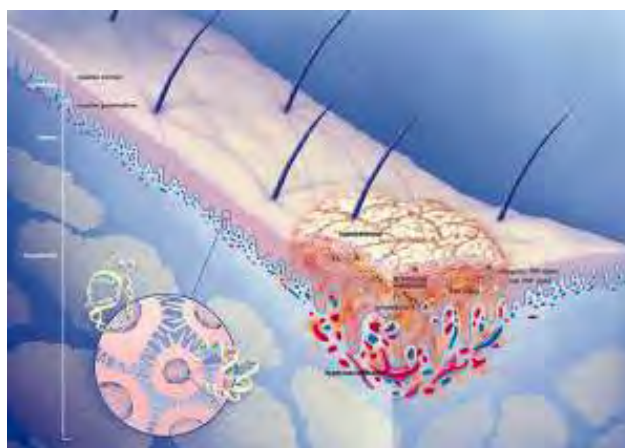
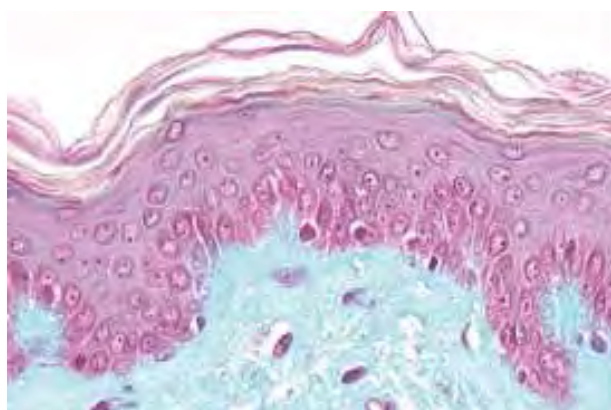




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



Θέμα:

**Φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου *ABCB1* και ανταπόκρισης
στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη σε ασθενείς με ψωρίαση στον
ελληνικό πληθυσμό**

Καρρά Αικατερίνη
Λάρισα 2013

ΤΙΤΛΟΣ

Φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου *ABCB1* και ανταπόκρισης στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό.

Pharmacogenetic study of *ABCB1* gene and response to treatment with cyclosporine in patients with psoriasis in the Greek population.

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζαφειρίου Ευτέρπη, Λέκτορας Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σαραφίδου Θεολογία και τον κ. Ζήση Μαμούρη που μου εμπιστεύτηκαν την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για τον χρόνο που διέθεσαν για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον κ. Δρ. Ιωάννη Βασιλόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Ένα επίσης ευχαριστώ, στην κ. Ζαφειρίου Ευτέρπη, Λέκτορα Δερματολογίας για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τους υποψήφιους διδάκτορες Κωνσταντίνα Σαρρή και Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για την υπομονή τους και την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Summary.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΨΩΡΙΑΣΗ	7
1.1.2 Τύποι και συμπτώματα της ασθένειας	7
1.2. Παθογένεια.....	10
1.3. Θεραπεία	12
1.4 Κυκλοσπορίνη (CsA).....	15
1.5. Σχέση κυκλοσπορίνης και P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr).....	18
1.6. Φαρμακογενετική	19
1.6.2. Φαρμακογενετικές μελέτες για την κυκλοσπορίνη	21
1.7 Το γονίδιο <i>ABCB1</i> και οι πολυμορφισμοί του.....	22
1.8 Σκοπός της εργασίας.....	24
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος	25
2.2 Έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	27
2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
2.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism)	32
2. 5. Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	34
2.6. Αυτόματη αλληλούχηση	34
2.7.Στατιστική ανάλυση των ασθενών για τον πολυμορφισμό T-129C	36
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	36
3.2. Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	38
3.3. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>ABCB1</i> με PCR.....	38
3.4. Ανάλυση SSCP	39
3.6. Στατιστική ανάλυση.....	42
4. Συζήτηση.....	43
Βιβλιογραφία	46

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια πολυπαραγοντική, χρόνια, φλεγμονώδης ασθένεια του δέρματος. Οι ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση συχνά απαιτούν θεραπεία με συστημικές ή βιολογικές μεθόδους, αλλά παρατηρείται σημαντική μεταβλητότητα, μεταξύ τόσο της κλινικής ανταπόκρισης, όσο και της τοξικότητας αυτών των παραγόντων. Η θεραπεία με τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μεθοτρεξάτη ή κυκλοσπορίνη, ή με συνδυασμό των δυο φαρμάκων αποτελεί την πιο συχνή μορφή θεραπείας. Η ανακάλυψη μοριακών δεικτών πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη της εξατομικευμένης θεραπείας. Ο ρόλος της φαρμακογενετικής γίνεται ολοένα και πιο σημαντικός, καθώς ένας βασικός στόχος της φροντίδας υγείας πλέον αποτελεί η εξατομικευμένη θεραπεία.

Σκοπός της εργασίας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs3213619 του γονιδίου *ABCB1*, με την κλινική απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία της κυκλοσπορίνης. Το γονίδιο *ABCB1* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr). Η κυκλοσπορίνη αποτελεί ένα υπόστρωμα της P-γλυκοπρωτεΐνης (P -gr), η οποία είναι ένα σημαντικός μεταφορέας εκροής (efflux transporter) που μπορεί να επηρεάσει τη φαρμακοκινητική πολλών φαρμάκων. Μεταξύ των ασθενών που λαμβάνουν κυκλοσπορίνη παρατηρείται μεταβλητότητα στην ανταπόκριση στη θεραπεία, η οποία πιθανόν να οφείλεται σε δυσλειτουργία της P-gr λόγω λειτουργικών μεταλλαγών στο γονίδιο που την κωδικοποιεί. Η μελέτη των πολυμορφισμών στο γονίδιο *ABCB1* θα μπορούσε να οδηγήσει στην διαμόρφωση ενός φαρμακευτικού σχήματος για την εξατομίκευση της θεραπείας για κάθε ασθενή.

Στα πλαίσια της εργασίας μελετήθηκαν, 84 ασθενείς με ψωρίαση από την Ελλάδα. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί βάσει του δείκτη PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η απόκριση στην θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και τη μεταβολή του PASI $< \text{ή} \geq 75\%$. Η εύρεση του γονότυπου των ασθενών πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών με τη μέθοδο PCR-SSCP και στη συνέχεια με αλληλούχηση των δειγμάτων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού T-129C του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες.

Summary

Psoriasis is a chronic, non-contagious, inflammatory skin disease. Patients with moderate-to-severe psoriasis frequently require treatment with systemic or biologic therapies, but considerable inter-patient variability is observed in both clinical responsiveness and toxicity relating to these agents. The use of immunosuppressive drugs, cyclosporine or methotrexate, or a combination of them in the treatment of psoriasis, is considered to be first-line systemic therapies. The discovery of predictive markers of treatment response would be a useful tool in the development of individually tailored treatment. The role of pharmacogenomics is becoming increasingly important as healthcare moves towards the ultimate goal of personalized medicine.

The purpose of this study is to test the association of *ABCB1* gene rs3213619 polymorphism to the clinical response of patients with psoriasis in cyclosporine treatment. The *ABCB1* gene is responsible for encoding P-glycoprotein (P-gp). Cyclosporine is a substrate for P-glycoprotein (P-gp), which is an important efflux transporter that can affect the pharmacokinetics of many drugs. Among patients receiving cyclosporine variability was observed in response to treatment, which may be due to dysfunction of P-gp by functional mutations in the gene that encodes it. The study of polymorphisms in the *ABCB1* gene could lead to the formation of a drug regimen to personalize treatment for each patient.

In this study 84 patients with psoriasis from Greece were included. Patients have been diagnosed with psoriasis based on the disease activity score PASI, upon the initiation of treatment. Response to treatment was evaluated according to the clinical protocols and the change in PASI by $<$ or $\geq 75\%$. The finding of the genotype of patients was based in DNA isolated from peripheral blood of patients with the PCR-SSCP method, and sequencing of the samples.

Analysis of results showed no statistically significant association for the above polymorphisms and the response of patients to treatment with methotrexate or cyclosporine for 3 months.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΨΩΡΙΑΣΗ

1.1.1 Τι είναι η ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια γενετική ασθένεια του ανοσοποιητικού συστήματος που προσβάλλει το δέρμα και/ή τις αρθρώσεις. Η πιο κοινή μορφή, η κατά πλάκας ψωρίαση, έχει ως αποτέλεσμα υπερυψωμένες, ερυθρές αλλοιώσεις που καλύπτονται από ασημο-λευκές φολίδες. Η ψωρίαση μπορεί να περιορίζεται σε λίγες αλλοιώσεις ή μπορεί να εκτείνεται σε πολύ μεγαλύτερες περιοχές του δέρματος (National Psoriasis Foundation, 2012).

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πολυπαραγοντική νόσος που επηρεάζει το 1,5-3% του πληθυσμού και συνήθως υποτροπιάζει. Η ασθένεια σχετίζεται με σημαντική ψυχοκοινωνική αναπηρία και προκαλεί υποβάθμιση της ποιότητας της ζωής που σχετίζεται με την υγεία, η οποία είναι συγκρίσιμη με άλλες χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και η κατάθλιψη. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει αυξημένη συν-νοσηρότητα καρδιαγγειακών συμπτωμάτων, παχυσαρκία και μεταβολικό σύνδρομο σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο έλεγχος της φλεγμονής, η οποία παρατηρείται στην ψωρίαση, μπορεί να είναι σημαντικός για τη μείωση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας. Οι θεραπείες της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης παρουσιάζουν σημαντική ποικιλία στην αποτελεσματικότητάς τους και συνδέονται με ποικίλους βαθμούς τοξικότητας και κόστους (Ryan *et al.*, 2011).

Έως και 30% των ανθρώπων με ψωρίαση αναπτύσσουν επίσης ψωριακή αρθρίτιδα, η οποία προκαλεί πόνο, δυσκαμψία και οίδημα μέσα και γύρω από τις αρθρώσεις (National Psoriasis Foundation, 2012).

1.1.2 Τύποι και συμπτώματα της ασθένειας

Η ψωρίαση προσβάλλει άτομα όλων των ηλικιών και διάφορα μέρη του

σώματος με κυριότερα τα γόνατα, τους αγκώνες, τον κορμό, το τριχωτό της κεφαλής και την πλάτη. Υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι ψωρίασης, η ψωρίαση κατά πλάκας, η σταγονοειδής ψωρίαση, η φλυκταινώδης ψωρίαση, η ερυθροδερμική ψωρίαση και η ανάστροφη ψωρίαση. Συνήθως η ψωρίαση εκδηλώνεται με ερυθρές λεπιώδεις πλάκες, οι οποίες καλύπτονται από αργυρόχροα λέπια. Ωστόσο, τα σημεία εντοπισμού και η ακριβής κλινική εικόνα εξαρτώνται από τον τύπο της ψωρίασης. Η κλινική εξέταση αρκεί για να γίνει η διάγνωση, ωστόσο ανά περίπτωση, μπορεί να χρειαστεί βιοψία δέρματος.

Ανάλογα με τον τύπο ψωρίασης εμφανίζονται τα εξής συμπτώματα:

Φλυκταινώδης ψωρίαση (εικόνα 1α):

- φλύκταινες που εμφανίζονται συνήθως στις παλάμες και τα πέλματα των ποδιών
- απολέπιση της πληγείσας περιοχής
- πυρετός
- κακουχία

Ψωρίαση κατά πλάκας (εικόνα 1β):

ερυθρές λεπιώδεις πλάκες που εμφανίζονται συνήθως στα γόνατα, τους αγκώνες στο κάτω μέρος της πλάτης, πίσω από τα αυτιά, και στο τριχωτό της κεφαλής

- κνησμός (αν και όχι κατά κανόνα)
- βλάβες στα νύχια (αποχρωματισμός, αποκόλληση)

Ερυθροδερμική ψωρίαση (εικόνα 1γ):

- ερυθρηματώδες δέρμα
- υπερπυρεξία (η οποία είναι πρόδρομος της θερμοπληξίας)
- υποθερμία

Σταγονοειδής ψωρίαση (εικόνα 1δ):

προσβάλλει συνήθως παιδιά και εφήβους, ειδικά μετά από βακτηριακή λοίμωξη του λαιμού:

- ερυθρές λεπιώδεις κηλίδες
- κνησμός (αν και όχι κατά κανόνα)

Ανάστροφη ψωρίαση (εικόνα 1ε) (προσβάλλει συνήθως ηλικιωμένους):

- ερυθρό διαβρωμένο δέρμα που εμφανίζεται στα σημεία που πτυχώνεται το δέρμα, όπως κάτω από τους μαστούς, στις μασχάλες και στη βουβωνική χώρα.



Εικόνα 1. Οι πέντε τύποι ψωρίασης: α) φλυκταινώδης, β) ψωρίαση κατά πλάκας, γ) ερυθροδερμική δ) σταγονοειδής, ε) ανάστροφη, (Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, <http://www.ygeianet.gov.gr/treatment.aspx?L=%CE%A8>)

Εξαιτίας της ύπαρξης διαφορετικών τύπων της ασθένειας, οι οποίοι έχουν διαφορετική βαρύτητα, είναι αναγκαία η ύπαρξη βιοδεικτών. Οι παράμετροι που συχνότερα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη βαρύτητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι ο BSA (Body Surface Area), το PGA (Physicians

Global Assessment) και ο PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Ο βιοδείκτης PASI εκτός από την έκταση, αξιολογεί και το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των ψωριασικών βλαβών και μπορεί να έχει τιμές από 1 ως 72. PASI 75 και PASI 90 σημαίνει μια 75% ή 90% αντίστοιχα βελτίωση του αρχικού PASI σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ο PASI έχει επικρατήσει, ως μέθοδος αξιολόγησης της βαρύτητας της νόσου, σε κλινικές μελέτες που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα φαρμάκων (Κοσμαδάκη και συν., 2007).

1.2. Παθογένεια

Η παθογένεια της ψωρίασης είναι πολύπλοκη, καθώς η εμφάνιση της οφείλεται τόσο σε γενετικά, όσο και σε περιβαλλοντικά αίτια. Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν ψωριασικές αλλοιώσεις ή να επιδεινώσουν τις ήδη υπάρχουσες. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι το αλκοόλ, το κάπνισμα, διάφορες λοιμώξεις, καθώς και ψυχογενείς και ενδοκρινείς επιδράσεις.

Η κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί επιδείνωση της ψωρίασης. Ιδιαίτερη συσχέτιση υπάρχει μεταξύ αλκοολισμού και ψωρίασης παλαμών/πελμάτων λόγω αποβολής της αιθανόλης μέσω των ιδρωτοποιών αδένων. Η αιθανόλη στο ψωριασικό δέρμα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και προκαλεί αύξηση της χημειοταξίας των πολυμορφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή κυτταροκινών (Ockenfels et al 1996).

Το κάπνισμα αποτελεί σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα, ιδιαίτερα στις γυναίκες, για την εκδήλωση ψωρίασης. Αναφέρεται ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και ψωρίασης παλαμών/πελμάτων. Η επίδραση του καπνίσματος στην ψωρίαση αποδίδεται στην αύξηση της κινητικότητας και χημειοταξίας των πολυμορφοκυττάρων και στην οξειδωτική βλάβη που προκαλεί ο καπνός (Higgins 2000).

Επίσης, διάφορες λοιμώξεις προκαλούν ή επιδεινώνουν την νόσο, όπως η στρεπτοκοκκική λοίμωξη. Σε αρκετούς ασθενείς με λοίμωξη από HIV η ψωρίαση εκδηλώνεται πέντε περίπου χρόνια μετά την μόλυνση (Wolfer et al 1998).

Όσον αφορά τους ψυχογενείς παράγοντες, το έντονο ψυχικό στρες προκαλεί επιδείνωση της ψωρίασης σε ποσοστό 66-71% των ασθενών, ενώ σε ποσοστό 35% η νόσος εκδηλώνεται σε περιόδους ψυχικής φόρτισης.

Η ψωρίαση υποχωρεί μερικώς ή ολικώς κατά την εγκυμοσύνη καθώς και μετά την χορήγηση ανταγωνιστών της αυξητικής ορμόνης (σωματοστατίνης). Το γεγονός αυτό αποτελεί σαφή ένδειξη συμμετοχής των ορμόνων και κατ' επέκταση των ενδοκρινών παραγόντων στην ψωρίαση (Camisa et al 1989).

Όσον αφορά τη **γενετική βάση** της ψωρίασης, αυτή έχει τεκμηριωθεί από επιδημιολογικά δεδομένα. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν δύο μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες έχουν διεξαχθεί στα νησιά Φερόε και στην Σουηδία. Στην πρώτη αναφέρεται ότι ποσοστό 91% των ασθενών με ψωρίαση είχαν τουλάχιστον έναν πρώτου ή δεύτερου βαθμού συγγενή με ψωρίαση (Lomholt 1963), ενώ στην δεύτερη υπολογίζεται ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της νόσου σε συγγενή πρώτου βαθμού ψωριασικών ασθενών ανέρχεται σε 2,7. Υπέρ της κληρονομικής φύσης της ψωρίασης συνηγορεί επίσης και η εμφάνιση της νόσου σε ποσοστό 65-72% των μονοζυγωτικών διδύμων, ενώ στα δυζυγωτικά δίδυμα το αντίστοιχο ποσοστό υπολογίζεται σε 15-30% (Bhalerao & Bowcock 1998).

Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλοι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με ψωρίαση. Ο γενετικός τόπος PSORS1 (psoriasis susceptibility 1) στην χρωμοσωματική περιοχή 6p21.3, ο οποίος εδράζεται στην περιοχή του MHC, θεωρείται ο σημαντικότερος και οι περισσότερες έρευνες εστιάζονται στην ανίχνευση του γονιδίου (ή των γονιδίων) που σχετίζονται με την ψωρίαση στην περιοχή αυτή. Τρία γονίδια που υπάρχουν σε αυτήν την περιοχή είναι εκείνα που κωδικοποιούν το *HLA-C*, την κορνεοδεσμοσίνη (Corneodesmosin, *CDSN*) και το *CCHCR*. Το *HLA-Cw*0602*, μια παραλλαγή του *HLA-C*, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη MHC τάξης I και έχει συσχετισθεί με την πρώιμη έναρξη της χρόνιας ψωρίασης κατά πλάκας και με την σταγονοειδή ψωρίαση. Αυτή η παραλλαγή έχει προσδιοριστεί ως η υπεύθυνη για την ψωρίαση στο γενετικό τόπο PSORS1. Το γονίδιο *CCHCR1* κωδικοποιεί την Coiled-Coil α -Helical Rod Protein 1, η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα, και ίσως είναι ένας ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων. Το γονίδιο *CDSN* κωδικοποιεί την κορνεοδεσμοσίνη, μια

γλυκοπρωτεΐνη η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα και ίσως συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα (Nair et al, 2006). Εκτιμάται ότι ο γενετικός τόπος *PSORS1* είναι υπεύθυνος για το 35-50% της γενετικής βάσης (Veal et al 2002), αλλά δεν εξηγεί το σύνολο της γενετικής προδιάθεσης. Οι Tomhfhrde et al (1994) ταυτοποίησαν ένα γενετικό τόπο στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 του ανθρώπου, τον *PSORS2*, ο οποίος φαίνεται πως συμβάλλει στην ψωριασική προδιάθεση. Άλλοι γενετικοί τόποι, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την ψωριασική προδιάθεση σε μελέτες διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων είναι οι εξής: ο *PSORS4* στην χρωμοσωματική περιοχή 1q, ο *PSORS5* στην 3q, ο *PSORS7* στην 1p και, για την ψωριασική αρθρίτιδα, ο *PSORS8* στην 16q (Tomhfhrde et al, 1994).

1.3. Θεραπεία

Δεν υπάρχει καμία ριζική θεραπεία για την ψωρίαση, αν και υπάρχουν αποτελεσματικές κατασταλτικές θεραπείες που στοχεύουν στο να εξαφανίσουν τις βλάβες ή στο να τις ελαττώσουν σε έκταση και βαρύτητα ώστε να είναι ανεκτές από τον ασθενή. Για την πλειονότητα των ασθενών, η ψωρίαση ακολουθεί μια χρόνια πορεία, που περιέχει και διαστήματα ύφεσης. Το πότε θα συμβούν οι υποτροπές είναι δύσκολο να προβλεφθεί (Κοσμαδάκη και συν., 2007).

Η ψωρίαση δε θεωρείται πια νόσος μόνο του δέρματος αλλά μία συστημική νόσος, όπως για παράδειγμα η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι ασθενείς με ψωρίαση εμφανίζουν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που δεν έχουν ψωρίαση και άλλες ασθένειες, όπως καρδιαγγειακές νόσους, υπέρταση, διαβήτη, δυσλιπιδαιμίες, παχυσαρκία, κατάθλιψη. Η ψωρίαση και οι παραπάνω αναφερθείσες παθήσεις πιθανολογείται ότι συνδέονται, τουλάχιστον εν μέρει, με τους προφλεγμονώδεις παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωρίασης (όπως ο TNF-α, tumor necrosis factor) και μάλλον και στην παθογένεια των σχετιζόμενων παθήσεων (ιδιαίτερα το υπερλιπιδαιμικό σύνδρομο). Χωρίς να υπάρχουν σαφή δεδομένα, γίνεται σήμερα η υπόθεση ότι, η υψηλότερη θνησιμότητα που έχουν οι ψωριασικοί ασθενείς (κυρίως λόγω επιπλοκών από το καρδιαγγειακό σύστημα), μπορεί να ελαττωθεί με έγκαιρη και τακτική θεραπευτική αγωγή για την ψωρίαση. Προκαταρκτικά δεδομένα προτείνουν ότι φάρμακα που ανταγωνίζονται τον TNF-α ελαττώνουν τον κίνδυνο για επιπλοκές από το καρδιαγγειακό σύστημα, αφού

ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που λάμβαναν για πολλά έτη αγωγή με αντι-TNF-α, είχαν λιγότερες επιπλοκές από το καρδιαγγειακό, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν λάβει αυτήν τη θεραπεία (Κοσμαδάκη και συν., 2007).

Η θεραπεία της ψωρίασης μπορεί να είναι αποκλειστικά τοπική, συστηματική ή συνδυασμός τοπικής και συστηματικής. Η θεραπεία επιλέγεται ανάλογα με την ανατομική εντόπιση, βαρύτητα, διάρκεια της νόσου, τις προηγούμενες θεραπείες, την ηλικία του ασθενούς καθώς και την ύπαρξη ή όχι αρθρίτιδας. Σημασία, επίσης, στην επιλογή της θεραπείας έχει ο βαθμός ψυχολογικής και κοινωνικής επιβάρυνσης που συνοδεύει την ψωρίαση. Συχνά αυτός υποτιμάται από τους θεράποντες ιατρούς και ίσως οδηγεί σε παροχή λιγότερης φροντίδας από αυτήν που πραγματικά χρειάζεται ο ασθενής. Για παράδειγμα, μια μικρής έκτασης ψωρίαση που αφορά όμως στις παλάμες, μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τη ζωή του ασθενούς (εργασία, κοινωνικές σχέσεις) και να χρειάζεται επιθετική θεραπεία. Η επίδραση της ψωρίασης στην ποιότητα ζωής του ασθενούς αξιολογείται με ερωτηματολόγια που συμπληρώνουν οι ασθενείς, με τα οποία καταρτίζεται ο δείκτης ποιότητας ζωής (Dermatology Life Quality Index - DLQI). Είναι εντυπωσιακό ότι μια έρευνα κατά την οποία συγκρίθηκαν η ποιότητα ζωής στην ψωρίαση, με αυτή που έχουν ασθενείς με άλλες ασθένειες, έδειξε, ότι οι ψωριασικοί υποφέρουν από τη νόσο τους περισσότερο από ότι οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, καρκίνο ή άλλες σοβαρές ασθένειες (Κοσμαδάκη και συν., 2007).

Η θεραπεία της ψωρίασης είναι ανάλογη του τύπου και της σοβαρότητάς της, για αυτό μπορεί να περιλαμβάνει –συνδυαστικά ή μη- επάλειψη των πληγείσων περιοχών με ειδικά φαρμακευτικά σκευάσματα, λήψη φαρμάκων, φωτοθεραπεία (εφαρμόζεται σε ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ψωρίαση) ή ακόμη και νοσηλεία (**Πίνακας 1**).

Μια από τις σημαντικότερες θεραπείες αποτελεί η συστηματική φαρμακευτική αγωγή. Οι περισσότεροι άνθρωποι που την χρησιμοποιούν έχουν μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση και/ή ψωριασική αρθρίτιδα. Η συστηματική φαρμακευτική αγωγή, επίσης, χρησιμοποιείται από τους ανθρώπους που δεν ανταποκρίνονται ή δεν είναι σε θέση να λάβουν φάρμακα που εφαρμόζονται τοπικά, ή υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Υπάρχουν δύο είδη συστηματικών φαρμάκων: παραδοσιακά συστηματικά, τα οποία δημιουργούνται από το συνδυασμό χημικών ουσιών και έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια, και βιολογικών, μια νεότερη κατηγορία φαρμάκων, που δημιουργούνται από ανθρώπινες ή ζωικές πρωτεΐνες (National Psoriasis Foundation,

2012).

Η φωτοθεραπεία με UVB (280-315 nm) παραμένει ένας από τους ακρογωνιαίους λίθους της θεραπείας (Menter *et al.*, 2010) και μπορεί να προκαλέσει κάθαρση της ψωρίασης σε περίπου 70% των ασθενών, συχνά με παρατεταμένη ύφεση (Coven *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 1999; Kirke *et al.*, 2007). Ωστόσο, η φωτοθεραπεία δεν χρησιμοποιείται ευρέως για την θεραπεία της ψωρίασης, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με ψωρίαση που υποβλήθηκαν σε αυτό το είδος θεραπείας ανέπτυξαν καρκίνο και μελανώματα. Χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμένη αγωγή. Ο μηχανισμός δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας κατά της ψωρίασης, οφείλεται ίσως στο ότι η παροδική ελάττωση της σύνθεσης του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών που προκαλεί η UVB οδηγεί σε ομαλοποίηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κερατινοκυττάρων (Piskin *et al.* 2003).

Πίνακας 1. Κατηγορίες φαρμάκων για την ψωρίαση (Κοσμάδρα και συν., 2007).

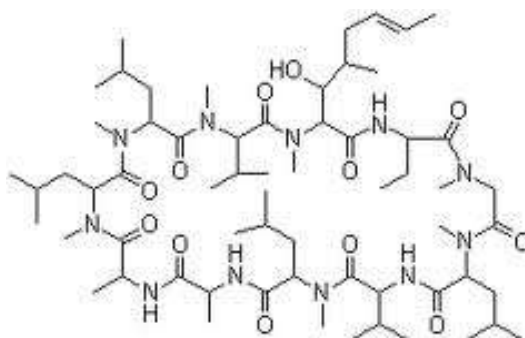
<p><u>Τοπικά</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Κορτικοστεροειδή • Ανάλογα της βιταμίνης D • Καλσιποτριόλη • Καλσιτριόλη • Τακαλιτόλη • Συνδυασμός μηταμεθαζόνης και καλσιποτριόλης • Ταζαροτένη • Ανθραλίνη • Πίσσα 	<p><u>Φωτοθεραπεία + Φωτοχημειοθεραπεία</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • UVB ευρέους φάσματος, UVB στενού φάσματος • PUVA* Psoralen Plus Ultraviolet A • Τοπική • Συστημική
<p><u>Συστημικά</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Μεθοτρεξάτη • Κυκλοσπορίνη • Ρετινοειδή • Φουμαρικά παράγωγα 	<p><u>Βιολογικά φάρμακα (αντισώματα)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Efalizumab (για το CD11a) • Etanercept (για το TNFα) • Infliximab -/- • Adalimumab -/-

* Υπεριώδης ακτινοβολία Α μαζί με το φάρμακο ψωραλένιο που καθιστά το δέρμα πιο ευαίσθητο στο φως.

Ένα από τα σημαντικότερα φάρμακα που χρησιμοποιείται ευρέως για την θεραπεία της ψωρίασης είναι η κυκλοσπορίνη. Σε αντίθεση, με άλλα φάρμακα όπως η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη είναι μη κυτταροτοξικό και μη μυελοτοξικό φάρμακο (Borel, 2002) και έτσι επιφέρει λιγότερες παρενέργειες στους ασθενείς. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, ο πολυμορφισμός T-129C του γονιδίου *ABCB1* και συσχετίστηκε με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Για το λόγο αυτό, παρακάτω αναλύονται η δράση και η βιοδιαθεσιμότητα της κυκλοσπορίνης, καθώς και η σχέση της με την P-γλυκοπρωτεΐνη.

1.4 Κυκλοσπορίνη (CsA)

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα κυκλικό εντεκαπεπετίδιο, υδρόφοβο μόριο προερχόμενο από το μύκητα *Tolypocladium inflatum* gums (Εικόνα 2). Η κυκλοσπορίνη παρουσιάζει εκλεκτική ανασταλτική δράση στα T- κύτταρα, αναστέλλοντας την οδό μεταγωγής σήματος που μεσολαβείται από υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα T-λεμφοκύτταρα (T cell receptor, TCR).



Εικόνα 2: Δομή κυκλοσπορίνης
(<http://biolexikon.blogspot.gr/2010/10/cyclosporine-or-cyclosporin-or.html>)

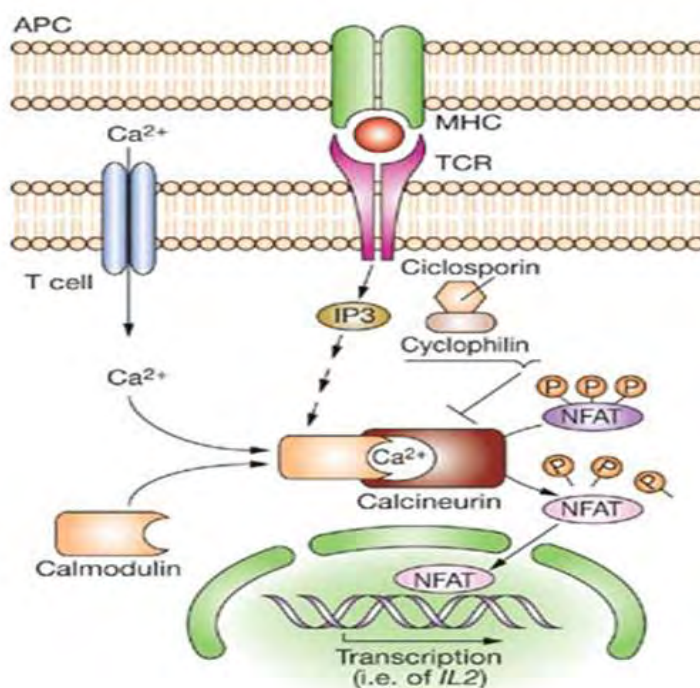
Η κυκλοσπορίνη είναι ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για να βοηθήσει στην πρόληψη της απόρριψης οργάνων μετά από μεταμόσχευση, και στη συνέχεια, στη θεραπεία διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η μυασθένεια

(myasthenia gravis, MG), ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και ο σακχαρώδης διαβήτης. Το 1997 η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε το Neoral (εμπορική ονομασία του φαρμάκου της κυκλοσπορίνης) για τη θεραπεία της σοβαρής ψωρίασης των ενηλίκων (Zhang *et al.*, 2008; National Psoriasis Foundation, 2012).

1.4.1 Δράση

Η κύρια δράση της κυκλοσπορίνης είναι η καταστολή της T-κυτταρικής απόκρισης, κυρίως των CD4+ T-κυττάρων. Η κυκλοσπορίνη παρεμβάλλεται στο αρχικό στάδιο της ενεργοποίησης των T-κυττάρων, αναστέλλοντας την μεταγραφή των λεμφοκυτταροκινών από τα T-κύτταρα, όπως της γ-ιντερφερόνη, του χημειοτακτικού παράγοντα των μακροφάγων και του ανασταλτικού παράγοντα των μακροφάγων. Επίσης, η παραγωγή της ιντερλευκίνης 2 από τα T-κύτταρα αναστέλλεται από την κυκλοσπορίνη. Έτσι αναστέλλεται η περαιτέρω ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Ο κυτταροπλασματικός υποδοχέας για την κυκλοσπορίνη είναι μια ουβιτικουιτινιωμένη πρωτεΐνη, η κυκλοφιλίνη. Αυτό οδηγεί στην αναστολή της λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης και της μεταγραφής των γονιδίων των λεμφοκυτταροκινών. Ο στόχος του συμπλόκου κυκλοφιλίνη A-κυκλοσπορίνη A είναι η καλσινευρίνη, μια φωσφατάση σερίνης-θρεονίνης. Η καλσινευρίνη είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια καταλυτική και μία ρυθμιστική υπομονάδα, που ενεργοποιούνται από την καλμοδουλίνη ως απόκριση στην αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των T-κυττάρων μέσω του T-κυτταρικού υποδοχέα, η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη, αυξάνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Η καλσινευρίνη ενεργοποιείται και αποφωσφορυλιώνει την κυτταροπλασματική υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται με άλλες υπομονάδες Fos και Jun. Έτσι επάγει την έκφραση των γονιδίων που ενεργοποιούν τα T-κύτταρα. Το σύμπλοκο κυκλοφιλίνης A-κυκλοσπορίνης A σταματάει την T-κυτταρική ενεργοποίηση, αποτρέποντας την εισαγωγή του NF-AT. Επομένως εμποδίζει την μετατόπιση του NF-AT εντός του πυρήνα, αναστέλλοντας κατά αυτό τον τρόπο την παραγωγή της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) από τα T-κύτταρα και κατ'έκταση την ενεργοποίηση και τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων από

την αυτοκρινή δράση της IL-2 (**Εικόνα 3**) (Page *et al.*, 2000). Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει επίσης την έκλυση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα και δρα κατασταλτικά μειώνοντας τα επίπεδα των διαφόρων κυτταρικών μορίων προσκόλλησης, προσδίδοντας τους αντι-φλεγμονώδη δραστηριότητα (Mrowietz *et al.*, 1999).



Εικόνα 3. Ο τρόπος δράσης της κυκλοσπορίνης: Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει τη δράση της καλσινευρίνης, μιας ασβεστο-εξαρτώμενης φωσφατάσης, επί της πυρηνικής μεταφοράς της και της ακόλουθης ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-AT και NF-κΒ. Συμβολισμός: APC: antigen-presenting cell, Ca^{2+} : calcium ions, IL-2: interleukin-2, MHC: major histocompatibility complex, NFAT: nuclear factor of activated T cells, P: phosphorylation, TCR: T-cell receptor (Massimo *et al.*, 2006).

Συνεπώς, η έλλειψη του παράγοντα NF-AT οδηγεί σε αναστολή μεταγραφής όλων των γονιδίων των κυτταροκινών, που ρυθμίζονται από τον NF-AT. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κύρια οδό ανοσοπαρέμβασης του φαρμάκου και οδηγεί σε μεταβολή στην έκκριση κυτταροκινών και στην έκφραση μορίων επιφανείας που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση (Σταυρόπουλος, 2002).

1.4.2 Βιοδιαθεσιμότητα κυκλοσπορίνης

Η κυκλοσπορίνη έχει στενό θεραπευτικό εύρος και μεγάλη διακύμανση μεταξύ ατόμων στην φαρμακοκινητική. Η παρακολούθηση των συγκεντρώσεων της κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα είναι συνεπώς απαραίτητη για τη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής δόσης, σε ασθενείς που λαμβάνουν αυτό το φάρμακο και την πρόληψη οξέων αντιδράσεων που σχετίζονται με τη κυκλοσπορίνη (Zhang *et al.*, 2008).

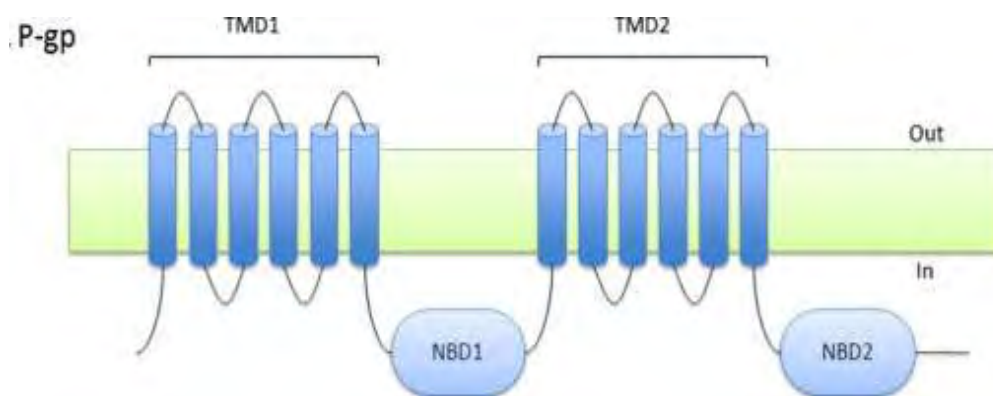
Η βιοδιαθεσιμότητα και η συστηματική κάθαρση της κυκλοσπορίνης ελέγχονται από τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 του κυτοχρώματος P450 (CYP) και από την αντλία εκροής P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr), έναν διαμεμβρανικό μεταφορέα. Η P-gr εκφράζεται στην γαστρεντερική οδό και το ήπαρ, περιορίζοντας την εντερική απορρόφηση και διευκολύνοντας τη χολική απέκκριση των λιπόφιλων φαρμάκων (Ryan *et al.*, 2011).

1.5. Σχέση κυκλοσπορίνης και P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr)

Η κυκλοσπορίνη αποτελεί ένα υπόστρωμα της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr), η οποία είναι ένα σημαντικός μεταφορέας εκροής (efflux transporter) που μπορεί να επηρεάσει τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική πολλών φαρμάκων. Η P-gr είναι μια διαμεμβρανική αντλία εκροής, η οποία εξωθεί από τα κύτταρα μια μεγάλη ποικιλία μορίων άσχετα δομικά μεταξύ τους, συμπεριλαμβανομένων πολλών φαρμάκων όπως αντιρετροϊκά (π.χ. νελφινάβιρη), ανοσοδιαμορφωτές (π.χ. κυκλοσπορίνη) ή υπολιπαιμικά φάρμακα (π.χ. ατορβαστατίνη). Η P-γλυκοπρωτεΐνη μεταφέρει επίσης πολλά φυσιολογικά υποστρώματα, όπως σφιγγολιπίδια, φωσφολιπίδια, κυτταροκίνες, στεροειδείς ορμόνες του φύλου, το β-αμυλοειδές πεπτίδιο και χοληστερόλη.(Fojo *et al.*, 1987)

Η P-gr σχηματίζει ένα ομοδιμερές, στο οποίο κάθε μονομερές αποτελείται από έξι διαμεμβρανικές περιοχές (TMD1,TMD2) και μια θέση δέσμησης ATP (Adenosine Triphosphate). Οι περιοχές δέσμησης του ATP ονομάζονται NBD1 και NBD2 (**Εικόνα 4**). Η P-gr εκφράζεται φυσιολογικά σε διάφορους ιστούς, όπως είναι το λεπτό και το παχύ έντερο, τα επινεφρίδια, τα νεφρά, το ήπαρ και τα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου και των όρχεων (Fojo *et al.*, 1987; Thiebaut *et al.*, 1987; Sugawara *et al.*, 1988; Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Η ιστική κατανομή υποδεικνύει ότι η P-gr μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην προστασία του οργανισμού ενάντια τοξικών ξеноβιοτικών.

Μεταξύ των ασθενών που λαμβάνουν κυκλοσπορίνη παρατηρείται μεταβλητότητα στην ανταπόκριση στη θεραπεία, η οποία πιθανόν να οφείλεται σε δυσλειτουργία της P-gp λόγω λειτουργικών μεταλλαγών στο γονίδιο που την κωδικοποιεί. (Εικόνα 4). Η P-γλυκοπρωτεΐνη, είναι προϊόν του γονιδίου *ABCB1*, το οποίο εμφανίζει διάφορους πολυμορφισμούς στον πληθυσμό. Η μελέτη των πολυμορφισμών στο γονίδιο *ABCB1* θα μπορούσε να οδηγήσει στην διαμόρφωση ενός φαρμακευτικού σχήματος για την εξατομίκευση της θεραπείας για κάθε ασθενή.



Εικόνα 4: Δομή της P-γλυκοπρωτεΐνης (Gong et al,2012).

1.6. Φαρμακογενετική

Η φαρμακογενετική είναι η μελέτη της σχέσης μεταξύ γενετικών παραλλαγών και της απόκρισης στα φάρμακα. Οι ασθενείς με διαφορετικούς πολυμορφισμούς για ένα γονίδιο μπορεί να ανταποκρίνονται διαφορετικά στη χορήγηση ενός φαρμάκου. Μια παραλλαγή θεωρείται πολυμορφισμός όταν το αλληλόμορφο εμφανίζεται σε ποσοστό 1% ή μεγαλύτερο του γενικού πληθυσμού. Ο πιο συχνός τύπος πολυμορφισμού είναι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP), που προκύπτει από τη αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του γονιδίου. Οι πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν φάρμακα, μεταφορείς και στόχους φαρμάκων, μπορεί να ευθύνονται για μέχρι και το 95% της υφιστάμενης ποικιλότητας μεταξύ ασθενών στην απόκριση στη θεραπεία. (Ryan et al., 2011). Με βάση αυτό, για την αύξηση της αποτελεσματικότητας και τη μείωση του κόστους της θεραπείας αναγκαία είναι η

εξατομίκευση της θεραπείας για κάθε ασθενή, με βάση κοινούς μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι θα επιτρέψουν την χρήση επιλεκτικών θεραπευτικών παραγόντων σε γενετικά διακριτές ομάδες ασθενών.

Η φαρμακογενετική εξετάζει την επίδραση της γενετικής παραλλαγής στην απόκριση των φαρμάκων, συσχετίζοντας την γονιδιακή έκφραση με την αποτελεσματικότητα ή τοξικότητα του φαρμάκου.

1.6.1. Σύγχρονες προσεγγίσεις εξατομικευμένης θεραπείας

Η μελέτη των μεταβολικών προφίλ μικρών μορίων (small-molecule metabolite profiles), ή «μεταβολομική» (metabolomics) είναι η συστηματική μελέτη ενός αριθμού μεταβολιτών, τα οποία ως μικροί μοριακοί βιοδείκτες αντιπροσωπεύουν το λειτουργικό φαινότυπο ενός βιολογικού συστήματος (Seli et al., 2007). Η μεταβολομική επιτρέπει την ανάλυση και σύγκριση βιοχημικών προφίλ σε ασθενείς με διαφορετική απόκριση στη θεραπεία. Αυτό ίσως καταστήσει δυνατή την πρόβλεψη της απόκρισης στη θεραπεία σε πρώιμο στάδιο, εντοπίζοντας ειδικά προφίλ σε ασθενείς οι οποίοι ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στο εν λόγω φάρμακο. Με τη χρήση φαρμακογονιδιωματικών προσεγγίσεων, όπως η φαρμακογενετική και η δημιουργία μεταγραφικών προφίλ, σε συνδυασμό με συμπληρωματικές τεχνικές, όπως η πρωτεομική και η μεταβολομική, έχουμε ένα αυξανόμενο οπλοστάσιο για να διευκολυνθεί η σφαιρική ανάλυση της απόκρισης στη θεραπεία και η κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης χρησιμοποιώντας βιοστατιστικές μεθόδους (Ryan et al., 2011).

Η ανάλυση μεταγραφικών προφίλ κυττάρων του δέρματος ή του αίματος, χρησιμοποιώντας ανάλυση RNA με μικροσυστοιχίες, παρέχει ένα μέσο για τη διερεύνηση των μοριακών οδών παθογένεσης σε κλίμακα εύρους γονιδιώματος και έχει τη δυνατότητα να διαδραματίσει ένα σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη λειτουργικά σχετικών βιοδεικτών για την ανταπόκριση στη θεραπεία της ψωρίασης. Η σύγκριση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ αποκρινόμενων και μη αποκρινόμενων ασθενών στα εκάστοτε φάρμακα, μπορεί να προσδιορίσει διαφορές, που προβλέπουν την απόκριση στη θεραπεία (Ryan et al., 2011).

Η απόκριση στη θεραπεία της ψωρίασης δεν είναι σταθερή με το χρόνο, με τους ασθενείς να χάνουν συχνά την θετική απόκριση στη θεραπεία με την πάροδο του χρόνου ή να αποτυγχάνουν να αποκριθούν σε ένα δεύτερο κύκλο μιας θεραπείας που στο παρελθόν ήταν επιτυχής. Αυτό οφείλεται στην ανοσογονικότητα, δηλαδή στην

πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης από έναν οργανισμό εξαιτίας της ανάπτυξης αυτοαντισωμάτων. Τα βιοφάρμακα, μοιάζουν με αρκετές ενδογενείς πρωτεΐνες. Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αναγνώριση των διαφορών ανάμεσα στις εξωγενείς και ενδογενείς πρωτεΐνες και γι' αυτό οι διαφορές μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογικές αντιδράσεις.

1.6.2. Φαρμακογενετικές μελέτες για την κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη είναι ένας ανταγωνιστής της καλσινευρίνης που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης και άλλων δερματοπαθειών, από τη δεκαετία του '80. Ωστόσο, οι δυσμενείς επιδράσεις της (adverse effects), έχουν περιορίσει τη χρήση της στη δερματολογία. Ειδικότερα, η κυκλοσπορίνη μπορεί να προκαλέσει χρόνια νεφροτοξικότητα, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία και νευρολογικές επιπλοκές (Ryan *et al.*, 2011).

Η βιοδιαθεσιμότητα και η συστηματική κάθαρση της κυκλοσπορίνης ελέγχονται από τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 του κυτοχρώματος P450 (CYP) και από την αντλία εκροής P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), έναν διαμεμβρανικό μεταφορέα. Η P-gp εκφράζεται στην γαστρεντερική οδό και το ήπαρ, περιορίζοντας την εντερική απορρόφηση και διευκολύνοντας τη χολική απέκκριση των λιπόφιλων φαρμάκων. και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCB1* επίσης γνωστό ως [MDR1]) (Ryan *et al.*, 2011).

Πολλά SNPs στα γονίδια *CYP3A4*, *CYP3A5* και *ABCB1* έχουν εντοπιστεί και πιστεύεται, εν μέρει, ότι ευθύνονται για τη μεταβλητότητα στη φαρμακοκινητική της κυκλοσπορίνης. Η φαρμακογενετική ανάλυση των πολυμορφισμών του *ABCB1* θα μπορούσε να βοηθήσει στη διαμόρφωση και στη βελτιστοποίηση της φαρμακευτικής αγωγής. Πράγματι, ορισμένοι πολυμορφισμοί του *ABCB1* έχουν συσχετισθεί με αλλαγές στη φαρμακοκινητική του φαρμάκου και με τη μεταβολή της βιολογικής απόκρισης στη θεραπεία με το φάρμακο. Η συχνότητα εμφάνισης των παραλλαγών και των απλοτύπων διαφέρουν ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα. Έτσι, ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες μπορεί να διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο αναποτελεσματικότητας στη θεραπεία (Garrigues A. 2002).

1.7 Το γονίδιο *ABCB1* και οι πολυμορφισμοί του

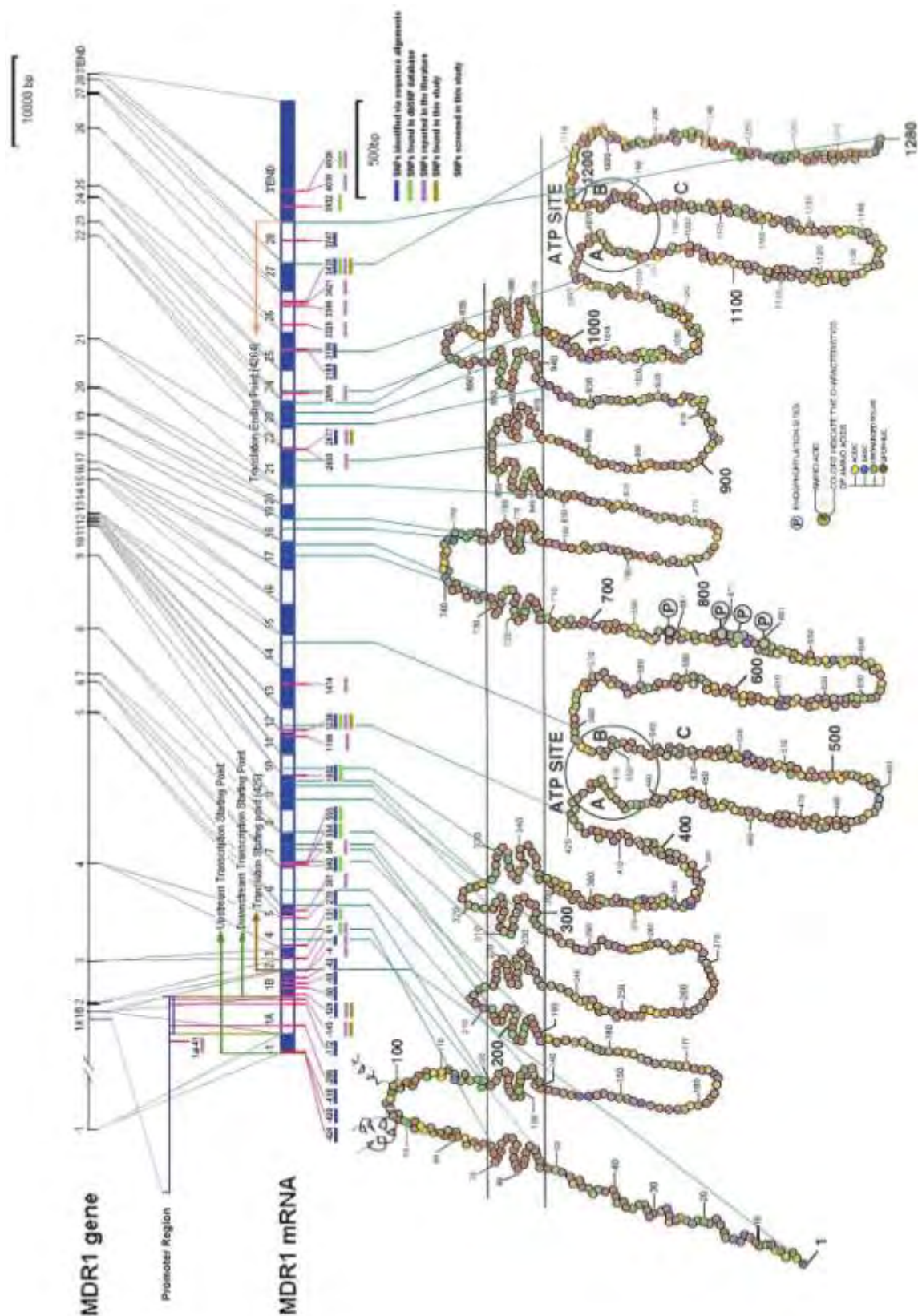
Η οικογένεια γονιδίων κασέτας (ή συστάδας) μεταφορέων που δεσμεύουν ATP (ATP-binding cassette, ABC) περιέχει περίπου 50 διαφορετικούς μεταφορείς που ρυθμίζουν τη διαμεμβρανική μεταφορά πολλών φυσικών υποστρωμάτων ή μεταβολιτών που σχετίζονται με την απορρόφηση ή αποβολή ξενοβιοτικών ουσιών, την ομοιοστάση των λιπιδίων ή με ανοσολογικούς μηχανισμούς. (Kroetz et al, 2003).

Το *ABCB1* είναι ένα ιδιαίτερα πολυμορφικό γονίδιο. Περισσότεροι από 50 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs) του γονιδίου *ABCB1* έχουν αναγνωριστεί, ορισμένοι από τους οποίους έχουν συσχετιστεί με διαφορές στην έκφραση του γονιδίου.

Οι πιο κοινοί και εκτενώς μελετημένοι SNPs περιλαμβάνουν μια αντικατάσταση C σε T στη θέση 3435 στο εξόνιο 26 (rs1045642), μια αντικατάσταση από C σε T στη θέση 1236 στο εξόνιο 12 (rs1128503) και μια αντικατάσταση από G σε T ή A στη θέση 2677 στο εξόνιο 21 (rs20325S2) (Kroetz et al, 2003). Η παραλλαγή G σε T ή A στη θέση 2677 στο εξόνιο 21 αποτελεί μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη που βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα της. Στη θέση 2677, που αντιστοιχεί στην αμινοξική θέση 893, η αλανίνη αντικαθίστανται από θρεονίνη ή σερίνη, οδηγώντας στην αλλαγή ενός λιπόφιλου αμινοξέως σε υδρόφιλο. Η αλανίνη είναι ένα δομικά ουδέτερο αμινοξύ που δεν εισάγει κάποιο περιορισμό στον κορμό του πολυπεπτιδίου. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι η υποκατάσταση της αλανίνης επηρεάζει τη γεωμετρική ακρίβεια της θέσης αλληλεπίδρασης και της δευτεροταγούς δομής (Kioka et al, 1989) (**Εικόνα 4**).

Πολυμορφισμοί που μεταβάλλουν την αλληλουχία του υποκινητή μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα και στον ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου. Αρκετές μελέτες έχουν προσπαθήσει να καθορίσουν τις ρυθμιστικές αλληλουχίες που συμμετέχουν στην μεταγραφή του γονιδίου (Ueda et al. 1987, Kioka et al. 1992, Cornwell & Smith, 1993).

Έχει βρεθεί ότι η αδενίνη στη θέση +1 και η θυμίνη στη θέση +3, μετά τη θέση έναρξης της μεταγραφής, είναι απαραίτητες για την λειτουργία του υποκινητή (van Groenigen et al., 1993). Επίσης, έχει δειχθεί πως ο πολυμορφισμός T-129C, ο οποίος βρίσκεται 7 bp καθοδικά από τη θέση έναρξης μεταγραφής σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της P-gp σε ετερόζυγη κατάσταση σε σχέση με την ομοζυγωτία για το συχνά απαντώμενο αλληλόμορφο (θυμίνη) (van Groenigen et al., 1993).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει τα SNPs της P-gr (μαύροι κύκλοι), τα οποία εντοπίζονται στην κωδική αλληλουχία της. Στο πάνω μέρος, φαίνονται τα 28 εξώνια του γονιδίου *ABCB1*, ενώ η κάθε περιοχή της P-gr που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο εξώνιο αντιστοιχίζεται με μια γραμμή (Ambudkar *et al.*, 2003).

1.8 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του μονοκλεοτιδικού πολυμορφισμού T-129C που εδράζεται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *ABCB1*, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Το προϊόν του γονιδίου *ABCB1* είναι η P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp) που δρα στην κατανομή της κυκλοσπορίνης στον οργανισμό. Η φαρμακογενετική μελέτη αυτού του πολυμορφισμού σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες στους πολυμορφισμούς C1236T και G2677T του γονιδίου *ABCB1* στοχεύει στην ανάδειξη ενός προγνωστικού απλοτύπου ανταπόκρισης, που θα οδηγήσει σε ένα εξατομικευμένο θεραπευτικό σχήμα για τον κάθε ασθενή.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς και θεραπευτική αγωγή

Απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος 84 ασθενών με ψωρίαση, οι οποίοι έλαβαν κυκλοσπορίνη στα πλαίσια της θεραπείας, για τουλάχιστον 3 μήνες. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση, με βάση το δείκτη PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Τα δείγματα δόθηκαν με έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης.

2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Με την διαδικασία της απομόνωσης, το DNA που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου διαχωρίζεται από τα άλλα κυτταρικά συστατικά, πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και κάποιες άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις.


Αντιδραστήρια

- ✓ **SSC:** ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα για την επαναιώρηση των ερυθροκυττάρων.
- ✓ **Οξικό νάτριο:** χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA
- ✓ **SDS:** Ανιονικό απορρυπαντικό που χρησιμεύει στην λύση του κυττάρου, δεσμεύοντας τα λιπίδια και καταστρέφοντας την δομή των κυτταρικών μεμβρανών.
- ✓ **Πρωτεΐνάση K:** είναι μια πρωτεάση σερίνης η οποία προκαλεί πέψη των πρωτεϊνών και απελευθερώνει το DNA. Επιπλέον, η πρωτεΐνάση K προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από τις νουκλεάσες.
- ✓ **Φαινόλη/χλωροφόρμιο:** χρησιμοποιείται για εκχύλιση του DNA.
- ✓ **Ισοπροπανόλη:** είναι μια αλκοόλη που κατακρημνίζει τα νουκλεϊκά οξέα.
- ✓ **Αιθανόλη 70%:** προκαλεί απομάκρυνση των αλάτων που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος.

Διαλύματα:

 **20X SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0):**

- Για την παρασκευή του διαλύματος 1X SSC γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 20X SSC.

 **3 M Οξικό Νάτριο (CH₃COONa):** διάλυση 40,81 gr οξικού νατρίου σε

ddH₂O. Ρύθμιση του pH στο 5,2 με σταγόνες CH₃COOH και ρύθμιση του όγκου με ddH₂O στα 100 ml. Για να παρασκευάσουμε διάλυμα οξικού νατρίου 0,2M γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 3M.

🌈 **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)**, 10 gr SDS σε ddH₂O και ρύθμιση του όγκου με ddH₂O στα 100 ml..

- Για την παρασκευή του διαλύματος 5% SDS γίνεται αραίωση του διαλύματος 10% SDS.

🌈 **Χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v)**: 24 ml χλωροφόρμιο: 1ml ισοαμυλική αλκοόλη.

Διαδικασία:

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται δείγμα 0,5 ml σε κάθε eppendorf, όπου γίνεται προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC.
2. Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3min στις 13000rpm.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1ml 1X SSC.
4. Γίνεται ξανά ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3min στις 13000rpm.
5. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, γίνεται προσθήκη 0,5ml οξικού νατρίου 0,2 M, 50 μl SDS 5% και 10μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml).
6. Ακολουθεί επώαση στους 55°C για περίπου 1h, υπό ανάδευση.
7. Προστίθεται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης.
8. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10min στις 13000rpm, στους 4°C.
9. Γίνεται η μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorfs και η προσθήκη 1ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
10. Ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5min στις 13000 rpm, στους 4°C.
11. Στην συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs, όπου προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλης και το δείγμα επωάζεται για 20 min

τουλάχιστον, στους -20°C.

12. Μετά την επώαση, γίνεται φυγοκέντρωση για 20 min στις 13000rpm, στους 4°C για να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
13. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθεται 1ml αιθανόλης 75%.
14. Στην συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρωση για 5 min στις 13000 rpm, στους 4°C.
15. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αποξηραίνεται.
16. Προστίθενται 100 µl ddH₂O στο DNA.
17. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

2.2 Έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος της απομόνωσης του DNA και των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Με την μέθοδο αυτή τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται σε ζώνες, ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους. Οι ζώνες αυτές εντοπίζονται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ένωσης που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA. Έτσι, φωτίζοντας το πήκτωμα με υπεριώδες φως, μπορούμε να παρατηρήσουμε αν ήταν επιτυχής ή όχι η απομόνωση του DNA.

Διαλύματα:

- **TAE 50X:** Tris Base 2 M, Οξικό οξύ (Acetic acid) 7,7 % w/v, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0,5 M.

Η παρασκευή διαλύματος 1X TAE, γίνεται αραιώνοντας το διάλυμα 50X TAE.

- **Loading buffer 6X:** Bromophenol blue 0,1% w/v, 1X TBE, Γλυκερόλη 8,7%.

Διαδικασία:

1) Παρασκευή πηκτώματος

- ❖ Τα «χτενάκια» τοποθετούνται στην πλάκα στην οποία παρασκευάζεται το πήκτωμα.
- ❖ 40 ml TAE 1X προστίθενται σε κωνική φιάλη και 0,3 gr αγαρόζης.
- ❖ Η αγαρόζη διαλύεται θερμαίνοντας το διάλυμα. Το διάλυμα, λοιπόν εξατμίζεται και η συγκέντρωση της αγαρόζης κατά προσέγγιση γίνεται 1%.

- ❖ Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει.
- ❖ 4 µl βρωμιούχου αιθιδίου 1mg/ml προστίθενται στο διάλυμα και πραγματοποιείται ανάδευση.
- ❖ Το διάλυμα τοποθετείται στην πλάκα με τα «χτενάκια», για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια του πηκτώματος.
- ❖ Το διάλυμα της αгарόζης αφήνεται μέχρι να πήξει για περίπου 30min.
- ❖ Τέλος, αφαιρούνται τα χτενάκια.

2) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

- ❖ Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE και τοποθετείται το πήκτωμα μέσα σ'αυτήν.
- ❖ Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετείται 3µl DNA (περίπου 200ng DNA) τα οποία αναμειγνύονται με 3 µl loading buffer.
- ❖ Εφαρμόζεται τάση 150V σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου 20 min, μέχρι η χρωστική να διανύσει απόσταση που αντιστοιχεί στο μέσο περίπου του πηκτώματος.
- ❖ Το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή UV.
- ❖ Οι ζώνες του DNA παρατηρούνται.
- ❖ Το πήκτωμα φωτογραφίζεται.

2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου με κατεύθυνση 5'-3'. Για να προκύψει μονόκλωνο μόριο DNA αρκεί η θέρμανση του δίκλωνου σε υψηλές θερμοκρασίες οπότε και οι κλώνοι διαχωρίζονται με την διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων. Και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Το ένζυμο απαιτεί ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει τη σύνθεση γι αυτό και στην αντίδραση προστίθενται δύο ειδικοί, συνθετικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές. Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή του ενός από τους δύο κλώνους του DNA-στόχου, ώστε να υβριδοποιείται σε αυτή. Οι κύκλοι θέρμανσης του DNA, υβριδοποίησης των εκκινητών στο υπόστρωμα και επέκτασής τους, που οδηγούν στη σύνθεση νέων μορίων DNA, επαναλαμβάνονται, έτσι ώστε μετά από n κύκλους η αντίδραση να

δίνει θεωρητικά έως 2^n δίκλωνα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές. (Αναστασιάδου και Καπράνος 1998).

Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης και αντιγραφής από την DNA πολυμεράση μπορούν να αυτοματοποιηθούν με τη χρήση μιας συσκευής, του θερμικού κυκλοποιητή, που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Ένας κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

- 1. Στάδιο αποδιάταξης DNA (denaturation):** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους $92-96^{\circ}\text{C}$ για περίπου 40sec. Οι δύο κλώνοι του DNA μετουσιώνονται καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου και διαχωρίζονται σε μονόκλωνες αλυσίδες.
- 2. Στάδιο υβριδισμού (annealing):** Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους $50-65^{\circ}\text{C}$ για περίπου 45 sec επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία του υβριδισμού ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m).
Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται κατά προσέγγιση εμπειρικά με την εξής σχέση 2°C για κάθε A ή T και 4°C για κάθε G ή C [$T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$]

3. Στάδιο επιμήκυνσης (extention): Η θερμοκρασία ανεβαίνει και πάλι στους 72°C περίπου ώστε η DNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη σύνθεση των νέων κλώνων.

Ο χρόνος του σταδίου αυτού εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR (περίπου 1 kb/min).

Πριν αρχίσουν οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι στον θερμικό κυκλοποιητή προηγείται το αρχικό στάδιο στο οποίο η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 95°C και διατηρείται για 3-10 min, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA. Μετά τον τελευταίο κύκλο ακολουθεί το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης κατά το οποίο η θερμοκρασία παραμένει στους 72°C για 10min. Αυτό επιτρέπει σε ατελώς επιμηκυμένα προϊόντα στο μίγμα της αντίδρασης να επιμηκυνθούν πλήρως. Στο τελικό στάδιο η

θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά και παραμένει στους 4°C, για προστασία των δειγμάτων(Αναστασιάδου και Καπράνος 1998).

Για την πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, η συγκέντρωση του MgCl₂ και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους σταδίου. Ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκε 35 φορές. Στους Πίνακες 2, 3 και 4 φαίνονται αντίστοιχα οι συνθήκες, τα συστατικά και οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1* που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs3213619.

Πίνακας 2. Συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1*

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία / Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C/4 min
Αποδιάταξη	95°C /40 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	58°C /45 sec
Επέκταση	72°C/30 sec
Τελική επέκταση	72°C /10 min

Πίνακας 3. Ποσότητες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση.

Συστατικά PCR	Ποσότητες συστατικών PCR
Υπόστρωμα DNA (200ng)	1 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x που περιέχει και 1,5 mM Mg1X)	5 μ l
MgCl ₂ (100mM)	1 μ l
Deoxynucleotide triphosphates(dNTPs)(10mM συνολικά)	1 μ l
Εκκινητής Forward (50pmol/ml)	1 μ l
Εκκινητής Reverse (50pmol/ml)	1 μ l
Taq DNA πολυμεράση (5U/ μ l)	0,2 μ l
ddH ₂ O	Έως τα 50 μ l

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *ABCB1*.

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	Μέγεθος προϊόντος PCR
rs3213619	ABCB1-T-129-F: 5'-ATT GGC TGG GCA GGA ACA-3' ABCB1-T-129C-R: 5'-TTT GGA AGA TAC TCC GAC-3'	170bp

Για να ελέγξουμε τα προϊόντα της PCR, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η διαδικασία έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.2, με μόνη διαφορά ότι για το μήκος των υπό μελέτη τμημάτων χρειάζεται πήκτωμα συγκέντρωσης 2% σε αγαρόζη. Αυτό συμβαίνει επειδή, ένα γραμμικό τμήμα DNA

συγκεκριμένου μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικούς ρυθμούς μέσω πηκτωμάτων που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αгарόζης.

2.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism)

Η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πολυμορφισμών. Πρόκειται για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων γραμμικών μορίων νουκλεϊκών οξέων λόγω διαφορών στην αλληλουχία τους. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA σε πηκτώματα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου, αλλά είναι ανεξάρτητη από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αντίθετα, στη συγκεκριμένη μέθοδο, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, η κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων DNA επηρεάζεται από διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους, ακόμα και από μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs). Σε διαφορετικά δείγματα, απουσία της συμπληρωματικής αλυσίδας, η μονόκλωνη αλυσίδα μπορεί να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλιών, προσδίδοντας μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή με αποτέλεσμα να εμφανίζουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (Hayashi, K., M. Orita, Y. Suzuki, and T. Sekiya. 1989).

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Η συγκέντρωση του πηκτώματος κυμαίνεται από 8-14% και εξαρτάται από το μήκος του μορίου που έχει ενισχυθεί. Όσο πιο μικρό είναι αυτό, τόσο πιο πυκνό πρέπει να είναι το πήκτωμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα συγκέντρωσης 14%. (Sambrook and Russel, 2001).

Συστατικά

Για ένα πήκτωμα 14%, διαστάσεων 19cm x 17,5cm και πάχος 2mm χρησιμοποιήθηκαν:

Ακρυλαμίδα	8,55gr
Δις- ακρυλαμίδα	0,2gr
TBE 10X	5ml
Γλυκερόλη 50%	6,5ml
APS 20%	350μl
TEMED	62,5μl

Ρόλος των αντιδραστηρίων:

- Η ακρυλαμίδα και η δις-ακρυλαμίδα: πολυμερίζονται και σχηματίζουν το πήκτωμα.
- TBE 10X: ρυθμιστικό διάλυμα που ρυθμίζει την ιονική ισχύ.
- TEMED (N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη): καταλύτης της αντίδρασης πολυμερισμού.
- APS (υπερθειικό αμμώνιο): ξεκινά την αντίδραση πολυμερισμού δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\cdot -}$.

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30min περίπου και το πήκτωμα έχει σχηματιστεί.

Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

Προετοιμασία και αποδιάταξη των προϊόντων PCR

Σε eppendorf του 0,5ml προστίθενται 5μl προϊόντος (δηλαδή 10% του συνολικού προϊόντος της PCR ή αλλιώς 20 ng) PCR και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (Denaturation Buffer, 0,5 N NaOH με 1,5 M NaCl) 7X, που μετουσιώνει το DNA. Ακολουθεί αποδιάταξη των δειγμάτων για 10 min στους 95 °C.

Τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA και στη συνέχεια στο πήκτωμα που βρίσκεται στη συσκευή αφού πρώτα προστεθεί σε αυτή ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 16h σε τάση 230V σε θερμοκρασία δωματίου.

Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver staining)

- 1^ο διάλυμα: 10ml αιθανόλη 100%, 1ml οξικό οξύ, ρύθμιση του όγκου στα 400ml με ddH₂O
- 2^ο διάλυμα: 200ml διαλύματος νιτρικού αργύρου (1gr AgNO₃ σε 1 lt ddH₂O).
- 3^ο διάλυμα: 3gr NaOH, 0,02gr NaBH₄ 1ml φορμαλδεΰδη και ddH₂O έως τα 200ml.

Η διαδικασία της χρώσης πραγματοποιείται υπό ανάδευση και έχει ως εξής:

1. Επώαση του πηκτώματος με 200 ml του διαλύματος 1 για 3min.
2. Απομάκρυνση του διαλύματος.
3. Επώαση του πηκτώματος με 200 ml του διαλύματος 1 για 3min.
4. Απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH₂O.
5. Επώαση με το διάλυμα 2 για 10 min.
6. Απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH₂O δύο φορές.
7. Επώαση με το διάλυμα 3 έως την εμφάνιση των ζωνών.
8. Απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα με ddH₂O.

Τα πηκτώματα αναλύονται για την εμφάνιση διαφορετικών προτύπων ζωνώσεων. Τα δείγματα που εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα επιλέγονται προς αλληλούχηση, αφού πρώτα γίνει καθαρισμός τους.

2. 5. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR που πρόκειται να σταλούν για αλληλούχηση έγινε με το PureLink PCR Purification Kit-Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση, άλατα που μπορεί να έχουν παραμείνει στο διάλυμα μαζί με τα προϊόντα PCR και ίσως προκαλέσουν προβλήματα στη διαδικασία της αλληλούχησης.

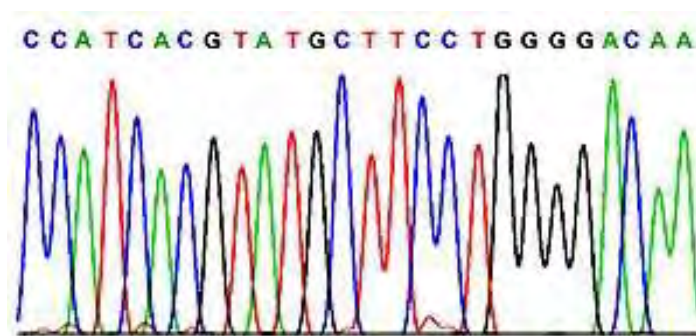
Στη συνέχεια, ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας του προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

2.6. Αυτόματη αλληλούχηση

Για την αλληλούχηση ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται μια σύνθετη αντίδραση τερματισμού. Η αντίδραση γίνεται παρουσία των τεσσάρων κανονικών

dNTPs, σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση, και τεσσάρων διδέοξυνουκλεοτιδίων (Dideoxynucleotide triphosphates, ddNTPs) σε μικρότερη συγκέντρωση, τα οποία είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Κατά τις αντιδράσεις επέκτασης σχηματίζεται μίγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός ddNTP σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Επειδή οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος, λόγω των διαφορετικών χρωμάτων, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο. Τα προϊόντα της αντίδρασης φορτώνονται και αναλύονται στην ίδια διαδρομή του πηκτώματος ή σε ένα τριχοειδές σωληνάκι μιας συσκευής αυτόματης αλληλούχησης. Τα σημασμένα τμήματα εντοπίζονται αυτόματα κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς κάθε διαδοχικό τμήμα, μεγαλύτερο από το προηγούμενο κατά μια βάση, διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης του μηχανήματος αλληλούχησης που λειτουργεί με λείζερ.

Πρόκειται για μια ακτίνα φωτός με μήκος κύματος που διεγείρει και τις τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές. Οι διεγερμένες χρωστικές επανέρχονται στο ενεργειακό επίπεδο ηρεμίας εκπέμποντας φως συγκεκριμένου μήκους κύματος χαρακτηριστικό για κάθε χρωστική. Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός και στέλνει ένα σήμα στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή αλληλούχησης. (Hood L.E, Hunkapiller M.W, and Smith L.M, 1987). Από τον φθορισμό που καταγράφεται λαμβάνεται τελικά η αλληλουχία με τη μορφή χρωματογραφήματος (ενδεικτικά, **εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Αλληλουχία με τη μορφή χρωματογραφήματος.

2.7. Στατιστική ανάλυση των ασθενών για τον πολυμορφισμό T-129C

Η μεταβολή στον δείκτη PASI των ασθενών $\geq 75\%$ θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Αντίθετα η μεταβολή στις τιμές του δείκτη PASI $\leq 50\%$ υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες (responders) και μη ανταποκριθέντες (non-responders). Διεξήχθη δοκιμή χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό οι πληθυσμοί των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 3 μήνες θεραπείας, μελετήθηκαν μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας 2 x 2 πίνακες συνάφειας. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, ο οποίος πέρασε τα κριτήρια Hardy-Weinberg, μελετήθηκε για συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, χρησιμοποιώντας το Cochran–Armitage trend test καθώς και άλλα test τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατή δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher’s exact test και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 84 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Η διάγνωση της ψωρίασης στους ασθενείς, ο έλεγχος της εξέλιξης ή μη της νόσου καθώς και η ανταπόκριση στη θεραπεία βασίστηκε στον δείκτη PASI. Μεταβολή $\geq 75\%$ στον δείκτη PASI των ασθενών θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Αντίθετα, μεταβολή $\leq 50\%$ στις τιμές του δείκτη PASI υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες (responders) και μη ανταποκριθέντες (non-responders). Σε όλους τους ασθενείς μελετήθηκε ο πολυμορφισμός rs3213619 του γονιδίου *ABCB1* μέσω

γονοτυπικής ανάλυσης ώστε να ελεγχθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτού και της απόκρισής τους στη συγκεκριμένη θεραπεία. Στον Πίνακα 5 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που πήραν μέρος στην μελέτη.

Πίνακας 5: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	41.23 \pm 15.53
Φύλο Α/Θ	39/45
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	4.3 \pm 1.8
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	37.9 \pm 12.5
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	39/84 (46%)
Αρχικό PASI, μέσος \pm ΤΑ*	13.65 \pm 4.76
PASI στους 3 μήνες, μέσος \pm ΤΑ*	3.82 \pm 4.10
Ανταποκριθέντες (PASI \geq 75%), ποσοστό	52 (62%)
Μη-ανταποκριθέντες (PASI<50%), ποσοστό	32 (38%)

*ΤΑ: Τυπική απόκλιση

Από τον Πίνακα 5 φαίνεται ότι από τους 84 ψωριασικούς ασθενείς, οι 39 είναι άντρες και οι 45 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 41 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 37 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 4 έτη. Στο 46% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση και με άλλες ασθένειες, δηλαδή εμφανίζεται συν-νοσηρότητα. Η ανταπόκριση στην θεραπεία (62%) βρίσκεται μέσα στο γενικό εύρος ανταπόκρισης των ασθενών (50-70%) στην κυκλοσπορίνη όπως διαπιστώνεται μέσα από της επίσημες κλινικές μελέτες (Hodges L.M. et al, 2003). Παρόλα αυτά, ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών (38%) φαίνεται πως δεν παρουσιάζει σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας μετά από τρίμηνη χορήγηση κυκλοσπορίνης.

3.2. Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από όλους τους ασθενείς από κύτταρα του περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος της ποιότητας του γενωμικού DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 1%. Το γενωμικό DNA που εξήχθη ήταν ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας (ενδεικτικά, Εικόνα 7).

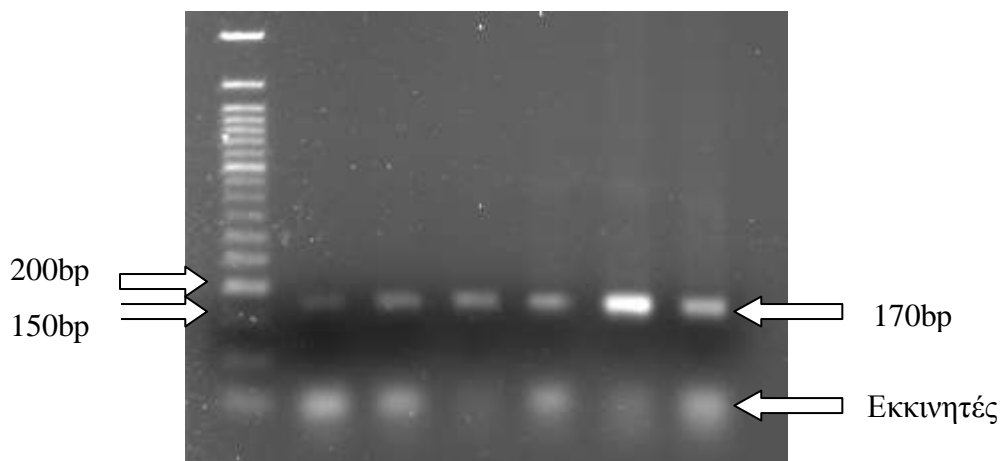


Εικόνα 7 : Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA από τέσσερα άτομα σε πήκτωμα αгарόζης 1%.

3.3. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1* με PCR

Πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *ABCB1*, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ABCB1-T-129-C-Forward και ABCB1-T-129C-Reverse. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε είναι 170bp, όπως αναμενόταν και από τη γενωμική αλληλουχία NG_011513.1 σε ομοπαράθεση με τους επιλεγμένους εκκινητές για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος. Ο εκκινητής ABCB1-T-129-C Forward υβριδοποιείται στα νουκλεοτίδια 117286-117303 της αλληλουχίας ενώ ο εκκινητής ABCB1-T-129C-Reverse υβριδοποιείται στα νουκλεοτίδια 117438-117455 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

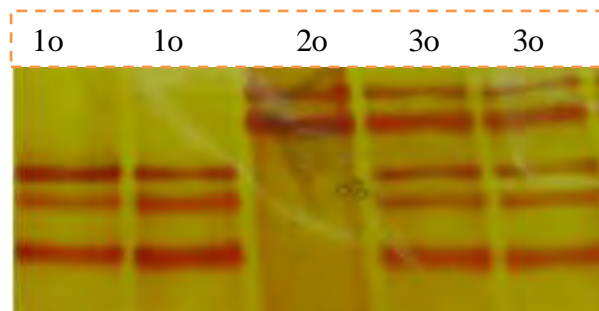
Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων γνωστών μοριακών μεγεθών, για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *ABCB1* και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.4. Ανάλυση SSCP

Για τον έλεγχο πιθανών διαφορετικών γονοτύπων μεταξύ των ασθενών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με τη μέθοδο SSCP. Από την ηλεκτροφόρηση ταυτοποιήθηκαν 4 διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων, που αντιστοιχούν σε 4 διαφορετικές αλληλουχίες. Το τέταρτο πρότυπο που εμφανίστηκε σε δύο ασθενείς, πιθανόν αφορά πολυμορφισμούς εντοπισμένους σε διαφορετική θέση από τον πολυμορφισμό T-129C (Εικόνα 9).

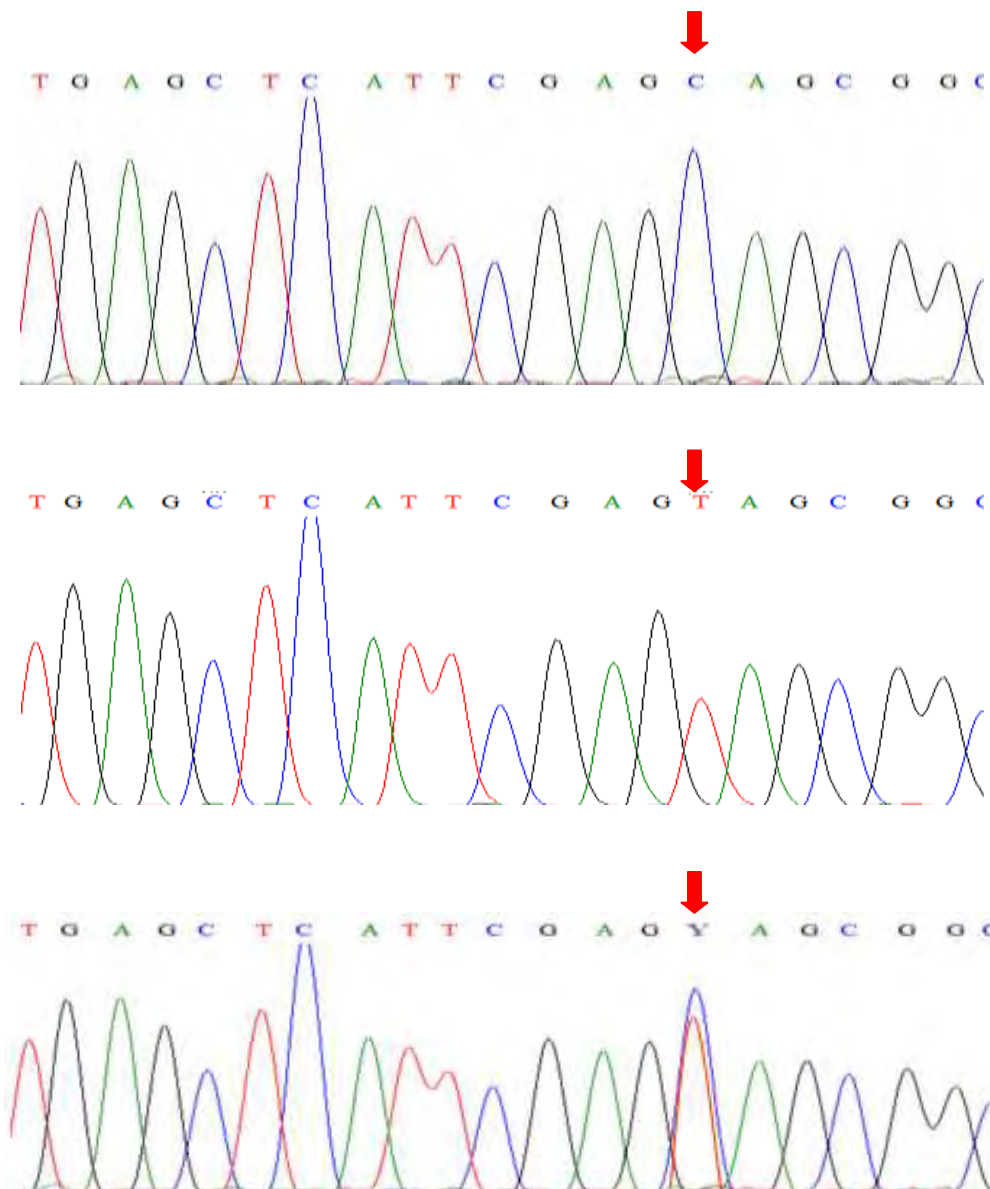


Εικόνα 9: Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανάλυσης SSCP (διακρίνονται τα τρία από τα τέσσερα διαφορετικά πρότυπα).

3.5. Αλληλούχηση

Τα διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν από την ανάλυση SSCP αλληλουχήθηκαν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης φάνέρωσαν την ύπαρξη 78 ατόμων ομόζυγων για το συχνά απαντώμενο αλληλόμορφο στον πληθυσμό (T/T), 1 άτομο ομόζυγο για το σπάνια απαντώμενο αλληλόμορφο στον πληθυσμό (C/C) καθώς και 5 άτομα που έφεραν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία (T/C) (Εικόνα 10). Από την

αλληλούχηση διαπιστώθηκε ότι το πρώτο πρότυπο στην Εικόνα 9, αντιστοιχεί σε άτομα ομόζυγα ως προς το αλληλόμορφο T, το δεύτερο πρότυπο σε άτομα ομόζυγα ως προς το αλληλόμορφο C και το τρίτο πρότυπο σε άτομα ετερόζυγα ως προς τα δυο αλληλόμορφα. Το τέταρτο πρότυπο που εμφανίστηκε, πράγματι, αφορά πολυμορφισμούς εντοπισμένους σε διαφορετική θέση από τον πολυμορφισμό T-129C και γι' αυτό δεν αξιολογήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την γονοτυπική ανάλυση παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7, διαχωρισμένα ανάλογα με την περιοχή και το νοσοκομείο από το οποίο προέρχονται.



Εικόνα 10: Τμήμα της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου *ABCB1* με μορφή χρωματογραφήματος. Το βέλος δείχνει τη θέση του πολυμορφισμού. Το γράμμα Y συμβολίζει τη ετεροζυγωτία μίας κυτοσίνης και μίας θυμίνης.

Πίνακας 6: Γονότυποι των ασθενών από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για τον πολυμορφισμό rs3213619 του γονιδίου *ABCB1*.

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
1	T/T	47	T/T
2	T/T	48	T/T
3	C/C	50	T/T
4	T/T	51	T/T
5	T/T	52	T/T
6	T/T	53	C/T
7	T/T	55	T/T
8	T/T	56	T/T
9	T/T	57	T/T
10	T/T	58	T/T
11	T/T	59	T/T
12	T/T	60	T/T
13	T/T	61	T/T
14	T/T	62	T/T
15	T/T	63	T/T
16	T/T	64	T/T
17	T/T	69	T/T
18	T/T	70	T/T
19	T/T	71	T/T
20	T/T	72	T/T
21	T/T	73	C/T
22	T/T	74	T/T
23	T/T	75	T/T
24	T/T	76	T/T
25	T/T	77	T/T
26	T/T	78	T/T
32	T/T	79	T/T
33	T/T	80	T/T
35	T/T	81	T/T
36	T/T	82	T/T
38	T/T	83	T/T
39	T/T	84	T/T
40	T/T	85	C/T
41	T/T	86	C/T
42	T/T	90	T/T
43	T/T	91	T/T
46	T/T	92	T/T

Πίνακας 7: Γονότυποι των ασθενών από τη Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης για τον πολυμορφισμό rs3213619 του γονιδίου *ABCB1*.

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
3Θ	T/T	23Θ	T/T
4Θ	T/T	24Θ	T/T
14Θ	T/T	25Θ	T/T
15Θ	C/T	26Θ	T/T
16Θ	T/T		

3.6. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του γονοτύπου των ασθενών ή ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στον Πίνακα 8. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται: α) οι γονοτυπικές συχνότητες των ασθενών και β) οι αλληλομορφικές συχνότητες σε σχέση με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επίσης, γ) η υπόθεση ότι το αλληλόμορφο T είναι επικρατές έναντι του αλληλομόρφου C, είτε τα άτομα είναι ομόζυγα ως προς το T είτε ετερόζυγα δ) η υπόθεση ότι το αλληλόμορφο C είναι επικρατές έναντι του αλληλομόρφου T. Οι τιμές p απέχουν από την τιμή ≤ 0.05 , που ορίστηκε ως το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Αυτό υποδεικνύει πως η εμφάνιση του αλληλομόρφου C στον υπό μελέτη πολυμορφισμό δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση ή μη στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ($P=0.585$). Μη στατιστικά σημαντική είναι και η συσχέτιση του αλληλομόρφου T με την ανταπόκριση στη θεραπεία (0.6190).

Πίνακας 8: Γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες του πολυμορφισμού Τα-129C σε σχέση με την ανταπόκριση ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες.

Γονίδιο/ Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<i>ABCB1</i> / T-129C (rs3213619)	Genotypic [TT/TC/CC]	48 / 3 / 1	30 / 2 / 0	0.845
	Cochran-Armitage [T/C]	99 / 5 (0.92)	62 / 2 (0.94)	0.709
	Επικρατές [(TT+TC)/CC]	51 / 1	32 / 0	0.619
	Υπολειπόμενο [TT/(TC+CC)]	48 / 4	30 / 2	0.585

Συνεπώς, από την στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης, εξάγεται το συμπέρασμα πως δεν υπάρχει κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού T-129C του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

4. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της συσχέτισης του μονοκλεοτιδικού πολυμορφισμού T-129C που εδράζεται στον υποκινητή του γονιδίου *ABCB1*, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Το προϊόν του *ABCB1* κωδικοποιεί την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp) που δρα στην κατανομή της κυκλοσπορίνης στον οργανισμό (Kroetz et al, 2003). Η αξιολόγηση της κλινικής εικόνας των ασθενών σε σχέση με τη χορηγούμενη θεραπεία επιβεβαίωσε την εμφάνιση της νόσου ανεξαρτήτως φύλου. Το ποσοστό των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη (62% των ασθενών) συμφωνεί με το ποσοστό ανταποκριθέντων ασθενών στην κυκλοσπορίνη που αναφέρεται στη

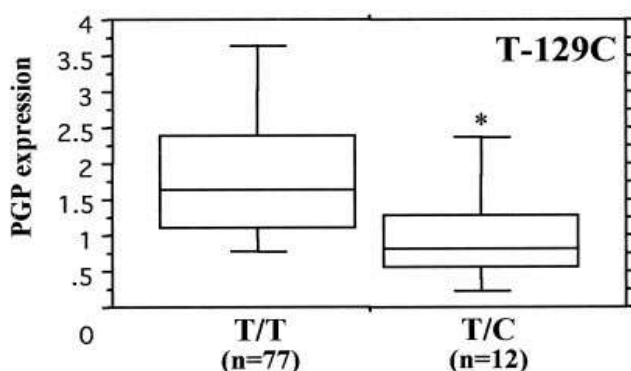
βιβλιογραφία (50-70% των ασθενών). (Hodges L.M. et al, 2003).

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης σε 84 ψωριασικούς ασθενείς για τον πολυμορφισμό T-129C δεν έδειξαν συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ($P=0,709$). Παρόλα αυτά ο αριθμός των ασθενών που συμπεριελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη είναι σχετικά μικρός για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη συσχέτισή του πολυμορφισμού με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Επιπλέον, οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται μόνο από δύο γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (89% των ασθενών προέρχεται από τη Λάρισα και 11% από τη Θεσσαλονίκη). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της γονοτύπησης μπορεί να μην αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό στο σύνολό του. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός των ασθενών ώστε και να επιτευχθεί αύξηση του συνόλου των ασθενών αλλά και να συμπεριληφθούν ασθενείς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας για την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων που θα αφορούν πλέον τη συχνότητα εμφάνισης αυτού του πολυμορφισμού στον ελλαδικό χώρο.

Τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία υποδεικνύουν πως το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού T-129C έχει μικρή συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό και ανόμοια κατανομή στους διάφορους πληθυσμούς. Παραδείγματος χάριν, στους Καυκάσιους εμφανίζεται με συχνότητα 0,06% (Cascorbi, 2006). Ωστόσο, στο γερμανικό πληθυσμό εμφανίζεται με συχνότητα 5,9% (Hoffmeyer et al, 2000) ενώ στο γαλλικό πληθυσμό με μόλις 0,04% (Jeannesson et al, 2007). Στους Κινέζους και τους Ινδούς το σπάνιο αλληλόμορφο έχει συχνότητα εμφάνισης 1,6% ενώ στους Ιάπωνες 6% (Tanabe et al, 2001). Φαίνεται ότι η διαφορετική συχνότητα εμφάνισης στους πληθυσμούς συνδυαστικά με τη γενικότερα χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου αλληλομόρφου, ταιριάζει με τη χαμηλή συχνότητα του πολυμορφισμού που βρέθηκε και στην παρούσα μελέτη (4,1%).

Με ανάλυση Western σε κύτταρα του πλακούντα για την διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού T-129C με την έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης προέκυψε ένα λειτουργικό αποτέλεσμα σχετικά με την έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης. Αποδείχθηκε ότι τα άτομα που φέρουν σε ετεροζυγωτία τον πολυμορφισμό T-129C εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης σε σχέση με άτομα ομόζυγα για το συχνά απαντώμενο αλληλόμορφο (Εικόνα 10). Η έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης ήταν 2 φορές χαμηλότερη στους ετεροζυγώτες από ότι στους ομοζυγώτες (Tanabe et al, 2001). Αυτό πιθανόν να οδηγούσε σε θετική

ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη για τον πολυμορφισμό T-129-C. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν διαπιστώνεται κάτι τέτοιο. Για να ελέγξουμε την έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης θα μπορούσαμε να πραγματοποιήσουμε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση σε ομόζυγα άτομα, προκαλώντας μετάλλαξη σε ένα από τα δυο αλληλόμορφα και παρατηρώντας την επίδραση που θα έχει η μετάλλαξη αυτή στην έκφραση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 10: έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης σε ομόζυγα άτομα T/T και σε ετερόζυγα T/C (Van Groeginen et al,1993).

Στο γονίδιο *ABCB1* έχουν μελετηθεί τρεις επιπλέον πολυμορφισμοί σε δυο μελέτες (Ελένης Ντούμου Μεταπτυχιακή εργασία 2012, Ιωακείμ Φάσσος Πτυχιακή εργασία 2012, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας). Οι δυο πολυμορφισμοί, C1236T και G2677T δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ο τρίτος πολυμορφισμός, C3435T, παρουσίασε συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Συγκεκριμένα, η συχνότητα του αλληλόμορφου T αυξάνεται στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία.

Η μέλετη του πολυμορφισμού T-129C σε σχέση με την ανταπόκριση στην κυκλοσπορίνη σε ψωριασικούς ασθενείς συμπεριλαμβάνεται σε μία μεγαλύτερη μελέτη φαρμακογενετικής ανάλυσης πολυμορφισμών του γονιδίου *ABCB1* και της θεραπείας με κυκλοσπορίνη, όπου θα συμπεριλαμβάνονται πολυμορφισμοί καθ' όλο το μήκος του γονιδίου. Στόχος αυτής της μελέτης είναι η ανάδειξη ενός προγνωστικού απλότυπου ανταπόκρισης, που θα οδηγήσει σε ένα εξατομικευμένο θεραπευτικό σχήμα για τον κάθε ασθενή με ψωρίαση, μειώνοντας τόσο το κόστος της θεραπείας

όσο και τις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου σε συνδυασμό με την έγκαιρη χορήγηση της κατάλληλης για τον κάθε ασθενή θεραπείας.

Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη αυτού του προγνωστικού απλοτύπου για την ανταπόκριση σε κυκλοσπορίνη στον ελληνικό πληθυσμό, καθιστώντας αναγκαία τη συνέχιση και την επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με ψωρίαση από όλη την Ελλάδα.

Βιβλιογραφία

1. Bhalerao J. and Bowcock A. M. (1998). The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Human Molecular Genetics* 7, 1537–1545.
2. Borel JF. History of cyclosporine and of its early pharmacological development. (2002). *Wien Klin Wochenschr* 114(12):433-437.
3. Caitriona R., Bowcock A. & Menter A. (2011). Use of pharmacogenomics in psoriasis. *Clin. Invest.* 1(3), 399–411.
4. Camisa C., Maceyko RF., O'Dorisio TM., Schacht GE., Mekhjian HS. (1989). Treatment of psoriasis with long-term administration of somatostatin analog 201-995. *Journal of the American Academy of Dermatology* 21(1):139-41.
5. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol. Ther.* (2006) 112 457–473
6. *Drug Insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression* Massimo C Fantini, Christoph Becker, Ralf Kiesslich and Markus F Neurath *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* (2006) **3**, 633-644
7. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM and Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:265–269.
8. Garrigues A., Escargueil A.E., Orlowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*(2002) 99 10347–10352
9. Gong Vascular Immunology Unit, Faculty of Medicine, The University of Sydney, Medical Foundation Building (K25), Room 208, 92–94 Parramatta Rd., Camperdown, NSW 2042, Australia.
10. Gow M. J., Hodges M. L., Chinn W. L., and Kroetz L. D. (2008). Substrate-Dependent Effects of Human ABCB1 Coding Polymorphisms. *JPET* 325:435–

11. Higgins E. (2000). Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 25(2):107-10.
12. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and active *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3473–3478.
13. Jeannesson E., Albertini L., Siest G., Gomes A.-M., Ribeiro V., Aslanidis C., Schmitz G., Visvikis-Siest S. (2007). Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21 411–418.
14. Kioka N, Tsubota J, Kakehi Y, Komano T, Gottesman MM, Pastan I and Ueda K (1989) P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal Pglycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 162:224–231.
15. Kirke SM, Lowder S, Lloyd JJ, et al. A randomized comparison of selective broadband UVB and narrowband UVB in the treatment of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1641–1646.
16. Kroetz D.L., Pauli-Magnus C., Hodges L.M. et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* (2003) 13 481–494.
17. Kroetz DL., Pauli-Magnus C., Hodges LM., Huang CC., Kawamoto M., Johns SJ., Stryke D., Ferrin TE., DeYoung J., Taylor T., Carlson EJ., Herskowitz I., 2003, Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene, *Pharmacogenetics* 13 (8):481-94.
18. Lomholt, G. Psoriasis, Prevalence, Spontaneous Course and Genetics. (G.E.C Gad, Copenhagen, 1963).
19. Loo TW and Clarke DM (1994) Functional consequences of glycine mutation in the predicted cytoplasmic loops of the P-glycoprotein. *J Biol Chem* **269**:7243–7248.
20. Massimo C Fantini; Christoph Becker; Ralf Kiesslich; Markus F Neurath Drug insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 2006;3(11):633-44.
21. Mrowietz U., Ruzicka T., (1999). Cyclosporin A for psoriasis, *Dermatologic Ther.* 11:60–6.

22. Nair R. P., Stuart P. E., Nistor I., Hiremagalore R., Chia N. V., Jenisch S., Weichenthal M., Abecasis G. R., Lim H. W., Christophers E. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum. Genet* 78, 827–851.
23. National Psoriasis Foundation (2012). Systemic medications for psoriasis and psoriatic arthritis, including biologics.
(<http://www.psoriasis.org/page.aspx?pid=455>)
24. Ockenfels HM, Uter W, Lessmann H, Schnuch A, Geier J: Patch testing with benzoyl peroxide: reaction profile and interpretation of positive patch test reactions. *Contact Dermatitis* 2009; 61(4):209-16 [3,470]
25. Lithium and psoriasis: cytokine modulation of cultured lympho-cytes and psoriatic keratinocytes by lithium. *Archives of Dermatological Research* 288(4):173-8.
26. Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation poly- morphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2766-2770.
27. Farmacologia-intergrada-Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffaman.(2000). ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
28. Piskin, Ultraviolet- B irradiation decreases IFN-g and increases IL-4 expression in psoriatic, lesional skin in situ and in cultured dermal T cells derived from these and lesions. *Exp Dermatol* 2003; 12: 172–180
29. Rund D, Azar I and Shperling O (1999) A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease. *Adv Exp Med Biol* **457**:71–75.
30. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, Hood LE. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 1985 Apr 11;13(7):2399–2412
31. Tanabe M., Ieiri I., Nagata N. et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2001) 297 1137–1143.
32. Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, Fernandez-Vina MA, Young M, Lory D, Morris L, Wuepper KD, Stastny P, Menter A. (1994). Gene for familial psoria-sis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Sci-ence* 20,264:1141-5.

33. Ueda K, Pastan I and Gottesman MM (1987) Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene. *J Biol Chem* **262**:17432–17436.
34. van Groenigen M, Valentijn LJ and Baas F (1993) Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter. *Biochim Biophys Acta* **1172**:138–146.
35. Weatherhead C. S., Farr M. P., Jamieson D., Hallinan S. J., Lloyd J. J., Wipat A. and Reynolds J. N. (2011). Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Remodeling and Clearance of Psoriasis Induced by UV Radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 131.
36. Wolfer LU., Djemadji-Oudjiel N., Hiletework M., Tebbe B., Husak R., Goerdts S., Orfanos CE. (1998). HIV-associated psoriasis. Clinical and histological observations in 36 patients. *Hautarzt* **49**(3):197-202.
37. Ya-tong Zhang, Li-ping Yang, Hong Shao, Ke-xin Li, Chun-hua Sun & Luwen Shi (2008). ABCB1 polymorphisms may have a minor effect on ciclosporin blood concentrations in myasthenia gravis patients. *Br J Clin Pharmacol* / **66**:2 / 240–246.
38. Αναστασιάδου Κ, Καπράνος Ν. Η Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές. 1998. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής **12**:100-108
39. Κοσμάδακη Μ., Αντωνίου Χ., Αυγερινού Γ., Στρατηγός Α.Ι., Σταυρόπουλος Π., Ποτουρίδου Ε., Πολυδώρου Α., Στεφανάκη Ε., Κατσάμπας Α., (2007). Ψωρίαση 2008: θεραπευτικός οδηγός. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* **18**:2 161-173.
40. Σταυρόπουλος Γ. Π. (2002). Κυκλοσπορίνη. Στοχεύοντας τον παθογενετικό μηχανισμό της ψωρίασης. *INFO DERMA Τεύχος*
41. Χαϊδεμένος Χ. Γ. (2008). Ψωρίαση και συν-νοσηρότητα. Οι συστηματικοί κίνδυνοι που κρύβονται σε μια συχνή δερματοπάθεια. *Ιατρικό Βήμα*. Σελ. 28-34.
42. <http://biolexikon.blogspot.gr/2010/10/cyclosporine-or-cyclosporin-or.html>
43. <http://www.drug-interactions.eu/en/phase3.htm>
44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
45. http://www.iatrikionline.gr/Derma_43/peri_43.htm